



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS

MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO

PROFESIONAL DE MEDICINA

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*SCHINUS AREIRA* SOBRE *ESCHERICHIA COLI* CEPA ATCC  
25922, COMPARADO CON CIPROFLOXACINO, ESTUDIO IN  
VITRO.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL  
DE MEDICO CIRUJANO

AUTOR:

MIGUEL ALEJANDRO SUAREZ ANAYA

ASESORES:

DRA. EVELYN GOICOCHEA RIOS

MG. JOSÉ LUIS FERNÁNDEZ SOSAYA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

Trujillo - Perú

2018

## **DEDICATORIA**

La vida es un proceso continuo de aprendizaje, todo tiene su momento y nunca es tarde para dar el primer paso, la presente Tesis, va dedicada a mis abuelos y padres Manuel Antonio Anaya Salas y Marjorie Esther Otiniano Amaya, los pilares de mi vida, quienes sentaron en mí, el deseo de superar siempre mis límites. A mi madre querida Elsie Liliana Anaya Otiniano, quien día a día me inculca la nobleza de su humanidad, a mi padre Saúl Gumerindo Suarez Gutiérrez, quien de una u otra forma siempre ha sustentado todas mis empresas quijotesas y caprichosas, a mis hermanos y familia quienes siempre me han brindado su apoyo e inmenso cariño, a mis amigos y compañeros con quienes compartí tantos momentos gratos, gracias a todos ustedes por haberle dado a mi vida tanta felicidad.

## **AGRADECIMIENTO**

Uno de los más grandes errores de nuestra época, es la falta de consecuencia, quiero agradecer encarecidamente a todos aquellos que siempre están a mi lado, dándome ánimos, aconsejándome, corrigiéndome, para hacer de mí una mejor persona, mi familia, mis maestros, mis amigos, los llevo siempre en mi mente y mi corazón, les doy mi palabra que desarrollaré esta mi segunda carrera de una forma alturada, en lo ético y académico, para así poder servir de la mejor manera a ustedes y a la sociedad... ¡Gracias totales!.

A mi Universidad Cesar Vallejo y a sus autoridades, docentes y miembros, quienes contribuyeron a mi formación profesional.

Trujillo, 26 de Noviembre del 2018.

## **DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD**

El presente informe de investigación, elaborado por mi persona, MIGUEL ALEJANDRO SUAREZ ANAYA, identificado con DNI N° 41624873, estudiante del último ciclo de la Escuela Académico Profesional de Medicina, se realizó de acuerdo al método científico, siguiendo los lineamientos de la Universidad Cesar Vallejo y DECLARO que los datos expuestos en la presente tesis, fueron los obtenidos durante el desarrollo de la misma, sin alteraciones ni sesgos.



FIRMA

DNI: 41624873

Miguel Alejandro Suarez Anaya

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>ii</b>
<b>DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD.....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.- .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Realidad Problemática: .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Trabajos Previos: .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Teorías Relacionadas al tema: .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5. Justificación del estudio: .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6. Hipótesis: .....</b>	<b>12</b>
<b>1.7. Objetivos:.....</b>	<b>12</b>
<b>II. MÉTODO.- .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Diseño de investigación: .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Variables, Operacionalización: .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Población y muestra: .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad: .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5. Métodos de análisis de datos: .....</b>	<b>16</b>
<b>2.6. Aspectos éticos: .....</b>	<b>17</b>
<b>III. RESULTADOS.- .....</b>	<b>18</b>
<b>IV. DISCUSIÓN.- .....</b>	<b>21</b>
<b>V. CONCLUSIONES.- .....</b>	<b>25</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.- .....</b>	<b>26</b>
<b>VII. REFERENCIAS.- .....</b>	<b>27</b>
<b>VIII. ANEXOS.- .....</b>	<b>32</b>

## RESUMEN

El presente trabajo de tipo experimental, evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Schinus areira* “molle peruano” y ciprofloxacino, sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922. El aceite esencial se obtuvo con el método de arrastre con vapor y el efecto inhibitorio in vitro se determinó con el método de Kirby-Bauer, se evaluó el efecto de cuatro concentraciones y se compararon con ciprofloxacino.

Se realizaron 14 repeticiones (placas con agar Mueller-Hinton cultivadas con *E. coli*), donde se colocaron los discos embebidos con los tratamientos antes mencionados, incubándoseles a 37°C por 24 horas.

Se realizó la lectura a través de observación directa, registrándose los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento generados para cada tratamiento, se consideraron controles negativos (discos con DMSO).

De acorde a lo establecido en el Estándar M100 del CLSI, se determinó que el aceite esencial de las hojas de *S. areira* presenta actividad antibiótica dosis dependiente, a dosis superiores al 75% se encontró gran actividad intermedia y a dosis inferiores *E. coli* presenta resistencia.

Se concluyó que si bien el aceite esencial de las hojas de *S. areira* presenta actividad antibiótica dosis dependiente, esta no es superior a la del ciprofloxacino.

**Palabras Clave:** *Schinus areira*, ciprofloxacino, *Escherichia coli*, Kirby-Bauer.

## ABSTRACT

The present experimental work, evaluated the antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Schinus areira* "molle peruano" and ciprofloxacin, on *Escherichia coli* strain ATCC 25922, the essential oil was obtained with the method of steam drag and the inhibitory effect In vitro was determined with the Kirby-Bauer method, four concentrations effect was evaluated and compared with cyprofloxacin.

Fourteen repetitions were made (plates with Mueller-Hinton agar cultivated with *E. coli*), where the disks embedded with the treatments were placed and incubated at 37 ° C for 24 hours.

The reading was made through direct observation, recording the diameters of the halos of inhibition of growth generated for each treatment, disks with DMSO was considered as negative controls.

Based on what is established in the CLSI Standard M100, it was determined that the essential oil of the leaves of *S. areira* presents dose-dependent antibiotic activity, at doses higher than 75% great intermediate activity was found, at lower doses *E. coli* presents resistance.

It was concluded that although the essential oil of the leaves of *S. areira* presents dose-dependent antibiotic activity, this is not superior to that of ciprofloxacin.

**Keywords:** *Schinus areira*, ciprofloxacin, *Escherichia coli*, Kirby-Bauer.

## I. INTRODUCCIÓN.-

### 1.1. Realidad Problemática:

El *Schinus areira* (molle, árbol del Perú o pimentero falso), de la familia Anacardiácea, es una especie cultivada que proviene de la región andina del Perú, en donde se le puede encontrar en estado silvestre, si bien inicialmente se le clasificaba como una variedad del *Schinus molle* L., actualmente es reconocido como una especie diferente. Este es un árbol perennifolio, de crecimiento rápido, que alcanza entre 4 a 8 metros de altura, suele florecer en primavera y verano, fructificando en otoño. Este árbol es muy utilizado de forma ornamental en parques y avenidas, aunque sus múltiples usos, se remontan a la antigüedad, destacando su uso medicinal como antimicrobiano en infecciones genitourinarias, antiinflamatorio en alteraciones menstruales, descongestionante bronquial, analgésico de dolor articular, muscular, e incluso dental, antifúngico y purgante <sup>(1,2,3)</sup>.

En la naturaleza podemos encontrar diversos metabolitos activos, con propiedades antibacterianas que no presentan el riesgo de generar resistencia como los antibióticos, es por esto que de forma permanente se realizan diversos trabajos de investigación que buscan agentes con propiedad antimicrobiana en los vegetales superiores. A nivel mundial y latinoamericano, podemos encontrar trabajos donde se evidencia el potencial antibacteriano del aceite esencial de las hojas y frutos de *S. areira* frente a bacterias gram negativas y positivas. Existen también diversos estudios de su actividad antifúngica, antioxidante, anticancerígena y como pesticida. La mayor cantidad de estudios se centran en la actividad antioxidante del aceite esencial de hojas de *S. areira*, donde se evidencia que poseen una alta concentración de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, algunos evidencian que incluso eliminan radicales libres fisiológicos como el superóxido y el óxido nítrico, los mismos que participan en muchas patologías <sup>(4,5,6,7)</sup>.

Se conoce que la composición del aceite esencial de *S. areira*, puede alterarse por diversos factores como la variabilidad genética, estación climática, fotoperiodo, humedad, incluso depende del método empleado para la obtención del aceite esencial. La mayoría de



estudios indican que el aceite esencial de *S. areira* está compuesto principalmente por hidrocarburos monoterpénicos (58.7%), seguido por los hidrocarburos sesquiterpénicos (22,9%); un estudio de especímenes de *S. areira* de dos diferentes regiones, evidencio que la composición de los aceites presentó una gran variación en sus concentraciones, los principales hidrocarburos monoterpénicos y sus concentraciones determinadas fueron: mirceno 1.7 - 38.7%; limoneno 2.5 - 35.7%,  $\alpha$ -felandreno 1.2 - 30.9%;  $\beta$ -felandreno 1.8 - 15%; sabineno 4.1 - 10.9% y canfeno 0.1 - 4.1% <sup>(8,9)</sup>.

*Escherichia coli* de la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, fermentador de lactosa y productor de indol. Forma parte de la flora regular gastrointestinal y con frecuencia se le encuentra en la vejiga femenina después del coito, por lo que es el principal patógeno en las infecciones de vías urinarias en mujeres jóvenes; también se le asocia a patologías como meningitis y sepsis. Presenta múltiples serotipos caracterizados por su fórmula antigénica, la cual se basa en un número asignado a los antígenos que presenta O, K o H. A nivel nacional la prevalencia que presenta este enteropatógeno varía según el área geográfica, la edad de los pacientes y el tipo de estudio realizado y la clase de *E. coli*, siendo sus frecuencias: enteroagregativa 10%, enteropatógena 9%, enterotoxígena 7%, enteroinvasiva 6%, por ultimo pero no menos importante la verotoxigénica 1%. Cabe añadir que los procesos diarreicos son más prevalentes en las zonas rurales de nuestro país <sup>(10,11,12,13,14)</sup>.

Para combatir a este microorganismo, con el paso de los años se han probado diversas alternativas de tratamiento; dentro de las farmacológicas encontramos el ciprofloxacino, actualmente es uno de los más empleados para las infecciones producidas por *E. coli*, y debido a diversos factores entre ellos la falta de adhesión al tratamiento, presenta un alto riesgo de que se genere resistencia bacteriana, es por esto que se buscan alternativas no farmacológicas eficaces contra este patógeno, como el uso de diversos metabolitos de diferente naturaleza extraídos de plantas, que no presenten el riesgo de generar resistencia, como es el caso del aceite esencial del *S. areira* <sup>(11,15)</sup>.

## 1.2.Trabajos Previos:

Martins M, et al<sup>16</sup> (Portugal, 2013), determinaron la composición del aceite esencial de hojas y frutos de *S. molle*, y evaluaron su actividad antioxidante y antimicrobiana. Los compuestos dominantes fueron los hidrocarburos monoterpenos:  $\alpha$  y  $\beta$  felandreno,  $\beta$  mirceno, limoneno y  $\alpha$  pineno. Para evaluar la propiedad antimicrobiana, confrontaron patógenos frecuentes, como la *E. coli*, encontrando para ésta, una concentración mínima inhibitoria de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , tanto para hojas como frutos, los halos de inhibición contra *E. coli* de los aceites esenciales de las hojas fueron de  $7.7 \pm 0.6$  mm., y para los frutos fueron de  $6.3 \pm 0.1$  mm. Concluyeron que las hojas y frutos de *S. molle* presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, destacando su potencial industrial en los campos farmacéuticos y alimentarios.

Hosni K, et al<sup>17</sup> (Túnez, 2011), evaluaron los cambios de las propiedades fitoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas, del aceite esencial de los frutos de *S. molle*, en diferentes periodos de su maduración: inmaduro, maduración intermedia y maduro. La propiedad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en disco de papel, frente a levaduras y bacterias, entre ellas *E. coli*, se consideró que un halo de inhibición  $\leq 6$  mm fue no activo. Los aceites de los frutos en maduración intermedia y maduros, presentaron mayor inhibición frente *E. coli*, 11 mm. y 10 mm., respectivamente. Los aceites de frutos de maduración intermedia fueron más eficientes, probablemente por su riqueza en compuestos oxigenados.

Guerra L, et al<sup>18</sup> (México 2017), analizaron la composición de los aceites esenciales de tres especies vegetales entre ellas *S. molle*; y determinaron sus actividades antioxidantes y antimicrobianas. Se caracterizaron dos fracciones, aceites incoloros y amarillos. El principal componente de *S. molle* fue el  $\alpha$ -felandreno. Para evaluar la actividad antimicrobiana se emplearon aceites obtenidos de las hojas y frutos, frente a *S. aureus*, *S. pyogenes* y algunos hongos dermatofitos. De los aceites de hojas, la fracción incolora presentó una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 250  $\mu\text{g/ml}$  frente *S. aureus*, y de 125  $\mu\text{g/ml}$  contra *S. pyogenes*; la fracción amarilla presentó una MIC de 250  $\mu\text{g/ml}$  frente a *S. pyogenes*. Los aceites de frutos no presentaron actividad antibacteriana; ambos aceites no mostraron actividad antifúngica.

Celaya L, et al<sup>6</sup> (Argentina 2016), determinaron la actividad antioxidante y evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *S. areira*. Las muestras se obtuvieron de tres áreas diferentes de la quebrada de Humahuaca, provincia de Jujuy en Argentina, las tres muestras mostraron actividad antimicrobiana y antioxidante. Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó la técnica de difusión en disco frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Rhodotorula* sp y *Candida albicans*, encontraron actividad antilevadura, y actividad moderada dosis dependiente contra las bacterias Gram positivas, no encontraron actividad contra la bacteria Gram negativa.

Rossetti V<sup>19</sup> (Argentina 2014), determinó la composición del aceite esencial de las hojas de *S. areira*, obtenido con el método de arrastre con vapor de agua y analizado mediante cromatografía de gas-líquido espectrometría de masas (GC-MS), encontró principalmente hidrocarbonados como los monoterpenos (65.65%) y sesquiterpenos (30.61%), seguidos en minoría por compuestos oxigenados como los monoterpenos oxigenados (0.71%) y los sesquiterpenos oxigenados (2.34%). También cuantifico los terpenos de la fracción hidrocarbonada mediante cromatografía en capa delgada y encontró que los sesquiterpenos se presentaron en mayor concentración, como el  $\beta$ -cariofileno (37.6%), el germacreno D (17.3%) y el biciclogermacreno (8%); seguidos por los monoterpenos: limoneno (6.5%),  $\beta$ -felandreno (3.3%), mirceno (3.0%),  $\alpha$ -felandreno (1.9%), p-cimeno (1.3%),  $\alpha$ -pineno (0.5%) y  $\beta$ -pineno (0.7%).

Gómez E<sup>20</sup> (Perú 2017), realizó un trabajo experimental in vitro, donde evaluó la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de *S. molle* a diez concentraciones del extracto sobre *Streptococcus mutans*, el método empleado fue la difusión en discos. La droga vegetal (hojas), fue colectada en el sector del AAHH “Los Algarrobos” (Piura), e identificada taxonómicamente en el Herbario Piurense (Universidad Nacional de Piura). Se encontró que todas las concentraciones evaluadas presentaron actividad antibacteriana, las concentraciones donde se observó mayor actividad fueron las de 25 y 22.5 mg/ml las que generaron halos de inhibición de 12.5 mm y 10.4 mm respectivamente, no se halló una diferencia significativa a comparación con el control positivo.

Luque P.<sup>21</sup> (Perú 2016), determinó la acción antibacteriana del aceite esencial del fruto de *Schinus molle* frente a *Staphylococcus saprofiticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica* y *Escherichia coli* (in vitro). Los frutos fueron recolectados en Santa Rosa de Quives, de la Provincia de Canta (cultivados a 940 m.s.n.m.). La acción antibacteriana fue evaluada con el método de difusión por excavación en placa, se encontró que los patógenos confrontados presentaron una mayor sensibilidad a un volumen de 0.25 ml de aceite esencial. Los halos de inhibición promedio para cada sepa fueron: *S. saprofiticus*: 19.19 mm., *S. aureus*: 19.15 mm., *S. entérica*: 20.981 mm. y para *E. coli*: 18.10 mm.

### **1.3. Teorías Relacionadas al tema:**

La *E. coli* de la familia Enterobacteriaceae, es una bacteria anaerobia facultativa Gram negativa, miembro de la microflora intestinal normal donde por lo general no produce enfermedad e incluso contribuye al funcionamiento y nutrición normal, además se le puede detectar en pequeñas cantidades en el sistema respiratorio alto y el aparato genital, cuando estas alcanzan tejidos fuera de sus zonas intestinales normales se vuelven patógenas. Este patógeno es el más aislado en las infecciones de vías urinarias, está presente en un 90% de las primoinfecciones urinarias en mujeres jóvenes. Muchas de sus cepas, son productoras de diarrea y se les clasifican en base a las características de sus propiedades de virulencia, en cinco clases principales: enteropatógena, enterotoxígena, enteroinvasiva, enteroagregativa y la productora de toxina Shiga, verotoxigénica o enterohemorrágica <sup>(10,11,22)</sup>.

Las cepas enterotoxigénicas, conocidas por causar de la “diarrea del viajero” y de la diarrea en lactantes; presentan factores de colonización específicos para seres humanos, lo que les facilita la adherencia a las células del intestino delgado. Estas cepas presentan plásmidos que les permiten producir exotoxinas termolábiles, termoestables o ambas <sup>(10,11,22)</sup>.

La toxina termoestable presenta una subunidad B, que se adhiere al borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado, permitiendo el ingreso de su subunidad A, la cual activa a la adenil ciclasa aumentando la concentración local de AMPc, esto desencadena la secreción prolongada e intensa de cloro y agua, con la inhibición de la reabsorción de sodio, el líquido distiende el intestino y se presentan la hipermotilidad con diarrea acuosa. La toxina termolábil es muy parecida a la producida por *Vibrio cholerae*, a diferencia de la anterior es antigénica, y la producción de anticuerpos que la neutralizan, permiten a las personas previamente expuestas a ser menos proclives a presentar diarrea, frente una segunda exposición a esta toxina. Las cepas capaces de producir las dos toxinas, producen cuadros diarreicos más graves. De forma general su transmisión se da por el consumo de agua contaminada con aguas servidas <sup>(10,11,22)</sup>.

Las cepas enteroagregativas, se caracterizan por producir diarrea acuosa aguda y crónica ( $\geq 14$  días). Su mecanismo patogénico se inicia con la adherencia de grandes agregados en la mucosa colónica, con la producción de una entero toxina y una hemolisina. Son la principal causa de diarrea del viajero, pues se transmiten por agua o comida contaminada <sup>(10,11,22)</sup>.

Las cepas enteropatogénicas, generan una inflamación leve y una diarrea acuosa que suele ceder espontáneamente, aunque puede tornarse crónica, en ambos casos, la duración puede abreviarse y curarse con ayuda antibiótica. El mecanismo de esta cepa empieza con la adhesión de la bacteria al intestino delgado, formando un pedestal bajo el sitio de unión (con la consecuente pérdida o aplanamiento de las microvellosidades) a través de la polimerización de filamentos de actina. Afectan sobre todo a niños menores de 3 años (diarrea en los lactantes), y se transmiten por agua o comida contaminadas y de persona a persona <sup>(10,11,22)</sup>.

Las cepas enterohemorrágicas, producen citotoxinas o verotoxinas, parecidas a las producidas por *Shigella*, actualmente se han determinado dos formas antigénicas de la toxina, y se les ha denominado: toxina similar a Shiga 1 y toxina similar a Shiga 2, estas inhiben la síntesis proteica conllevando a la apoptosis. Algunas de estas cepas, como la O157:H7,

incluso producen toxinas que dañan el endotelio vascular del intestino (colitis hemorrágica) y los glomérulos (síndrome hemolítico urémico, que produce insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia). Su transmisión se relaciona con la ingesta de carne de res molida, leche no pasteurizada, cidra de manzana, espinaca, lechuga o mayonesa, también puede darse de persona a persona y tiene mayor incidencia en verano <sup>(10,11,22)</sup>.

Las cepas enteroinvasivas, no son móviles y para desencadenar un cuadro patológico requieren la ingesta de un gran inóculo (10<sup>8</sup> microorganismos), su mecanismo es similar al de la shigelosis, invade células epiteliales de la mucosa intestinal sin producir toxinas, produciendo una colitis inflamatoria que no se distingue de la que produce *Shigella*. No es muy común que causen epidemias y su transmisión también se asocia al consumo de alimentos contaminados <sup>(10,11,22)</sup>.

En países en vías de desarrollo, este patógeno es un gran problema de salud pública, es muy importante realizar un adecuado diagnóstico. Existen varios métodos, con diversos grados de especificidad y sensibilidad, en las infecciones urinarias, la bacteriuria generalmente alcanza grandes cifras ( $\geq 10^5$ /ml), lo que permite su fácil detección con la tinción de Gram, incluso en muestras no centrifugadas. En las gastroenteritis, inicialmente se puede realizar un examen directo con azul de metileno en heces, para valorar la respuesta celular, o un frotis fecal de leucocitos para determinar y cuantificar la presencia de PMN (su presencia sugiere en gran medida una enterocolitis bacteriana aguda); una prueba más sensible y específica (90 a 100%), aunque es más difícil acceder a ella, la lactoferrina fecal (proteína de unión del hierro en PMN), nos permite diferenciar la enterocolitis bacteriana aguda de la gastroenteritis viral <sup>(10,11,22)</sup>.

El cultivo bacteriano es positivo en casi un 5% de los casos, por lo cual se emplea solo en casos de severidad, en los casos de diarrea sanguinolenta se debe priorizar el coprocultivo en un medio adecuado para así maximizar la sensibilidad de la prueba. El reconocimiento apropiado de las diversas cepas patogénicas de *E. coli* no es fácil de realizar por medio del

cultivo; por lo que se requieren métodos moleculares (inmunológicos y biológicos). En situaciones apremiantes como epidemias, se emplean pruebas de aglutinación empleando un antisuero específico contra los antígenos “O” de la *E. coli*, con fines académicos y de investigación, se emplean técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa y la hibridación de DNA con el fin de detectar toxinas LT, ST y Stx, incluso los genes involucrados en la virulencia <sup>(22,42)</sup>.

Como se puede observar en todo lo mencionado anteriormente, generalmente las infecciones por *E. coli* no son mortales, sin embargo muchas de sus complicaciones lo son, por esto el manejo inicial se basa en resolverlas y prevenirlas. El manejo farmacológico dependerá del lugar de la infección y la clínica presente, como el subsalicilato de bismuto (barato, eficaz e inocuo incluso durante 3 semanas), o los probióticos que disminuyen la probabilidad de infección en los viajeros en un 15%, incluso disminuyen el tiempo de duración de las diarreas en muchos casos; aunque son eficaces no se suele recomendar el uso de antimicrobianos como profilácticos para la diarrea de los viajeros. Por el riesgo de las complicaciones, la fármaco resistencia, la infección por una cepa dañina o invasora, se suele iniciar antibióticoterapia empírica frente a la clínica <sup>(24)</sup>.

Dentro de los fármacos empleados para combatir las infecciones por *E. coli*, se encuentran las fluoroquinolonas, como el ciprofloxacino, que pertenece a la segunda generación de análogos del ácido nalidíxico, presenta una actividad excelente contra gramnegativos y moderada contra grampositivos. Este actúa inhibiendo la topoisomerasa II y la topoisomerasa IV durante la replicación, bloqueando así la síntesis de ADN bacteriano con la consecuente muerte de la bacteria. Este antibiótico es muy efectivo en infecciones urinarias, osteomielitis y en cuadros diarreicos bacterianos causados por *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* toxigénica y *Campylobacter* <sup>(15,25)</sup>.

Existen múltiples estudios buscando tratamientos alternativos, para combatir las bacterias, de forma eficaz y sin las complicaciones que presentan los antibióticos, dentro de

estas encontramos al Molle o *Schinus areira*, de la familia Anacardiácea, anteriormente considerado como una variedad del *Schinus molle* L; es oriunda de los valles interandinos del sur, centro y norte del Perú, donde se le encuentra en todo el ande peruano, entre los 10 a 35,000 m.s.n.m.; prefiere los suelos sueltos y profundos (textura franca o franca-arenosa), no desarrolla bien en zonas pedregosas. Se le encuentra en áreas ribereñas, alrededores costeros, pastizales, bosques abiertos, bordes de caminos y áreas de desechos, esto es gracias a su capacidad para tolerar sequías y aridez extrema, aunque se habitúa a zonas con inundaciones estacionales, esto le permite desarrollarse en regiones templadas y semiáridas, tropicales, inclusive en regiones subtropicales y áridas <sup>(26,27,28)</sup>.

Sus flores son blancas pequeñas, dispuestas en panículas, con un pedicelo corto de 1 a 2 mm de largo, con cinco sépalos de 1 mm de largo y cinco pétalos de 2 mm de largo, es una planta dioica, presenta flores masculinas y femeninas separadas. Las femeninas presentan estaminodios y ovario coronado, con un estilo y estigma; las masculinas tienen diez estambres. Sus frutos son drupas (bayas pequeñas) que cambian de color con la maduración, de verde a rojo o rosa azulado; tienen de 3 a 6 mm de ancho, la cascara adelgaza y parece papel cuando ya han madurado, esto facilita la liberación de las semillas, aunque esta planta también tiene capacidad de propagación vegetativa, pequeños animales y aves que consumen el fruto, facilitan su dispersión <sup>(27,28)</sup>.

Sus usos medicinales son conocidos ancestralmente, y estos dependen de la parte de la planta que se emplee, por ejemplo, los antiguos peruanos preparaban un fermento con los frutos la “chicha de molle”, la cual empleaban para problemas de orina, riñones y vejiga, además se emplean los frutos como expectorantes, antirreumáticos, antiparasitarios y emenagogos; la corteza y su oleorresina se emplean como cicatrizantes, emenagogos, antirreumáticos, purgante y para la obturación de muelas cariadas; los brotes tiernos y sus hojas soasadas se emplean como cicatrizantes, antirreumáticas, digestivas y analgesia de cefalalgia (parches en sienes); sus ramas se empleaban para curar el “susto”, y su ceniza para preparar jabón <sup>(7,28)</sup>.



De las hojas también se obtiene un aceite esencial aromatizante, que se industrializa en perfumería, dentífrica y jabonería. Sus aceites esenciales presentan dos fracciones, el aceite fijo (1.2%) y el aceite volátil (2.87%), asimismo el aceite fijo está compuesto por: ácido linoléico, ácido oleico, ácido octanoico, ácido palmítico, patchouleno y ácido esteárico; el aceite volátil está compuesto por: canfeno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -cariofileno,  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -felandreno,  $\beta$ -pineno,  $\delta$ -limoneno, 3-careno, spatulenol. La constitución de estos aceites, varía de 50 a 300 sustancias químicas y suele estar compuesta por alcoholes, aldehídos, hidrocarburos terpénicos, cetonas, derivados oxigenados, fenilpropanoides, compuestos fenólicos, ésteres, éteres, entre otros. Investigaciones previas, indican que algunos componentes oxigenados como el eugenol y el anetol, presentes en los aceites volátiles, serían los que le confieren su actividad antimicrobiana, sobretodo en Gram positivas y en algunas Gram negativas <sup>(7,29,30)</sup>.

Las hojas también presentan: flavonoides libres y combinados, taninos, saponinas, carbohidratos, lignocérico; además de triterpenos y glicósidos. Dependiendo de la planta, varía el sitio de las células que producen los aceites esenciales y/o de su lugar de reserva, por ejemplo: glándulas (cítricos, eucaliptos), células oleíferas (cúrcuma, jengibre, vainilla), tricomas (Asteráceas, Solanáceas, Geraniáceas) o canales secretorios (artemisia, anís, pino). Lamentablemente, no existe información disponible que nos indique el sitio de producción específico de nuestra planta en estudio, el molle, pero la bibliografía revisada indica que la mayor concentración de aceites esenciales se encuentran en las hojas y el fruto, siendo el  $\beta$ -mirceno, el  $\alpha$ -felandreno y el  $\beta$ -pineno, los compuestos presentes en mayor proporción <sup>(30,31)</sup>.

Existen diversas técnicas para extraer la fracción volátil que se desea estudiar en una planta medicinal o aromática. Entre estas, la destilación es una de las más sencillas, esta, aprovecha la diferencia del punto de ebullición que presentan los variados componentes de los aceites esenciales, generalmente, esta se realiza a presión atmosférica normal (corresponde a 760 mm Hg), si esta se reduce o aumenta, también disminuye o eleva el punto de ebullición

(oscilan entre los 150 y 300°C). Se pueden emplear diversos disolventes, como el agua, que nos permite obtener un compuesto con dos fases no miscibles (por su polaridad), lo que facilita su posterior separación y recolección. Para facilitar este proceso la droga vegetal, como las hojas del molle, pueden ser o no, previamente procesadas (cortadas, molidas o secadas) <sup>(30,31,32)</sup>.

#### **1.4. Formulación al Problema:**

¿En qué medida el aceite esencial de *Schinus areira* “Molle peruano” tiene efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino, en un estudio in vitro?

#### **1.5. Justificación del estudio:**

Si bien, de todas las infecciones producidas por *E. coli*, la mayor cantidad no son mortales, algunas de sus cepas tienen la capacidad de producir toxinas que causan gran daño, incluso hasta la muerte si estas se complican, por todo esto, en nuestro país son un gran problema de salud pública. El presente trabajo busca aportar con conocimientos básicos sobre la actividad antibacterial que presenta el aceite esencial de *Schinus areira* sobre la *E. coli*, para el desarrollo de tratamientos médicos alternativos, no muy costosos y que no presenten la desventaja de formación de resistencia, como en el caso de ciprofloxacino, que en la actualidad, es uno de los fármacos que se emplean de forma rutinaria en este tipo de infecciones. Así mismo, se pretende incentivar la realización de futuras investigaciones, como la determinación de los efectos adversos del uso de este aceite esencial en humanos, que de ser inocuo sería muy fácil de industrializar y comercializar a un bajo costo para infecciones gastrointestinales y urinarias.

## 1.6. Hipótesis:

**H<sub>1</sub>:** El aceite esencial de *Schinus areira* “Molle peruano” tiene mayor efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino, en un estudio in vitro.

**H<sub>0</sub>:** El aceite esencial de *Schinus areira* “Molle peruano” no tiene mayor efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino, en un estudio in vitro.

## 1.7. Objetivos:

### Objetivo General:

Evaluar el efecto antibacteriano de *Schinus areira* “Molle peruano” sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 a comparación con ciprofloxacino, en un estudio in vitro.

### Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Schinus areira* “Molle peruano” al 100, 75,50 y 25% de concentración, sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 a las 24 horas post exposición.
- Determinar el efecto antibacteriano del ciprofloxacino a 5 mg de concentración sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 a las 24 horas post exposición.

## II. MÉTODO.-

### 2.1. Diseño de investigación:

**Tipo de Investigación:** Aplicado.

**Diseño de Investigación:** Experimental con post prueba, fueron dos grupos: el experimental y el control, donde se aplicaron los aceites esenciales y el fármaco antibiótico de forma aleatoria.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5

Dónde:

RG: Grupos de estudio.

G1: Aceite esencial de la hoja de *Schinus areira* al 100%.

G2: Aceite esencial de la hoja de *Schinus areira* al 75%.

G3: Aceite esencial de la hoja de *Schinus areira* al 50%.

G4: Aceite esencial de la hoja de *Schinus areira* al 25%.

G5: Tratamiento con ciprofloxacino a 5 mg de concentración.

O: Medidas del diámetro del halo de inhibición posterior al estímulo, a las 24 horas, no se requirieron medidas basales.

### 2.2. Variables, Operacionalización:

**Variables Independientes:** Aplicación del aceite esencial de hoja de *S. areira* (al 100, 75, 50 y 25%) y ciprofloxacino a 5 mg de concentración.

**Variable Dependiente:** Efecto antibacteriano sobre *E. coli* cepa ATCC 25922.

### Operacionalización:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
<b>V. I:</b> Aplicación del aceite esencial de hoja de <i>Schinus areira</i> y ciprofloxacino.	El aceite esencial de <i>Schinus areira</i> , presenta dos fracciones, el fijo (1.2%) y el volátil (2.87%), sus componentes oxigenados (como el eugenol y el anetol), le confieren su actividad antimicrobiana. <sup>(7)</sup> Ciprofloxacino: Es un antibiótico sintético, derivado del ácido nalidíxico, del grupo de las flúorocinolonas, tiene un amplio espectro bactericida por su efecto inhibidor de la síntesis de ADN bacteriano. <sup>(15)</sup>	Aceite esencial de <i>Schinus areira</i> al 100, 75 50 y 25% de concentración.  Ciprofloxacino a 5 mg de concentración.	G1 G2 G3 G4  G5	Cualitativa nominal
<b>V. D:</b> Efecto antibacteriano sobre <i>E. coli</i> .	Es la propiedad de un compuesto que dependiendo de su estructura y mecanismo de acción, puede ser bactericida o bacteriostático, este último requiere la colaboración del sistema inmune del paciente, pues la bacteria permanece viable, puede recuperarse y multiplicarse nuevamente. <sup>(33)</sup>	Se consideró como efecto antibiótico sobre <i>E. coli</i> a los halos de inhibición: sensible $\geq 21$ mm, actividad intermedia 16 – 20 mm y resistente $\leq 15$ mm. <sup>(34)</sup>	Efecto antibacteriano sensible.  Efecto antibacteriano intermedio.  Sin efecto antibacteriano.	Cualitativa nominal

### 2.3. Población y muestra:

**Población:** Estuvo constituida por cultivos de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 en placas Petri, procesadas en el Laboratorio Clínico San José.

**Muestra:** Estuvo constituida por los cultivos viables y no contaminados de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 en placas Petri; con los discos embebidos del aceite esencial de *Schinus areira* “Molle peruano”.

El tamaño muestral se obtuvo mediante la fórmula de comparación de dos promedios. <sup>(29)</sup>

$$n = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

**Donde:**

$Z_{\alpha} = 1.96$  Asumiendo un nivel de confianza de 95%.

$Z_{\beta} = 0.84$  Asumiendo una potencia de 80%.

$X_1 = 21$  mm Diámetro del halo de inhibición sensible de ciprofloxacino <sup>(34)</sup>.

$X_2 = 18$  mm Diámetro del halo de inhibición del aceite esencial de *Schinus areira* <sup>(21)</sup>.

$\sigma = 2.1$ .

$n = 14$  (número de placas Petri mínimas para cada tratamiento).

Se inocularon 28 placas Petri con medio de cultivo, realizándose 14 observaciones para cada tratamiento y 14 controles negativos, según el protocolo tradicional de cultivo, para obtener un nivel de confianza del 95%.

## **2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad:**

**La Técnica:** Fue experimental in vitro y consistió en la observación directa.

**Procedimiento:** Se extrajo el aceite esencial de las hojas de *Schinus areira* y se prepararon las diluciones con dimetilsulfóxido (DMSO) al 100, 75 50, y 25%. Las mismas con las que se embebieron los discos de difusión. El control negativo se evaluó con discos embebidos solamente con DMSO y se emplearon discos de ciprofloxacino a 5 mg de concentración, determinándose el efecto de estos sobre las cepas de *E. coli* ATCC 25922 (Anexo 1).

**Instrumento:** Se empleó una ficha elaborada por el autor, donde se registró para cada cultivo en placa Petri, los halos de inhibición generados por el aceite esencial de hojas de *Schinus areira* al 100, 75, 50 y 25% y del ciprofloxacino a 5 mg, esto se registró a las 24 horas posteriores a la colocación de los discos (Anexo 2).

**Validación y confiabilidad del instrumento:** La ficha de recolección de datos fue validada por dos expertos en procesos microbiológicos, luego de evaluar el objetivo y las variables de estudio (Anexo 3).

## **2.5. Métodos de análisis de datos:**

Las observaciones obtenidas, se registraron en una ficha de recolección de datos, luego se procesaron en una base de datos del programa SPSS versión 25.0 para Windows. Se efectuó la prueba de los opuestos y se determinó la normalidad y la homogeneidad de las varianzas.

Para determinar la homogeneidad del conjunto de datos obtenidos se empleó la prueba de Levene, con la que se busco hallar diferencias entre las variaciones de la población. En lo correspondiente a la normalidad y debido a que el tamaño muestral fue pequeño se empleó el Test de Shapiro–Wilk.

Como no todas las concentraciones evaluadas presentaron un comportamiento normal se procedió a emplear la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La misma que determinó que la actividad antibacteriana difiere entre los tratamientos evaluados.

## **2.6. Aspectos éticos:**

Para ejecutar el presente proyecto de tesis, se obtuvo el permiso del Comité de Investigación de la Escuela de Medicina UCV.

Esta investigación ha sido realizada de forma independiente, y el autor no presenta conflicto de interés alguno, toda la información brindada en el presente trabajo de investigación, no se ha alterado ni plagiado, dando cumplimiento al artículo 48, capítulo 6 del Trabajo de Investigación, del código de ética del Colegio Médico del Perú.

Así mismo busca generar conocimientos y alternativas de tratamiento, con el único fin de promover y velar por la salud de los seres humanos, sin generar daño al medio ambiente, tal como lo establecen los criterios establecidos en las Normas de Ética en la Investigación, de la Declaración de Helsinki.



### III. RESULTADOS.-

**TABLA N° 1: Efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de *S. areira* sobre *E. coli* Cepa ATCC 25922, comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro:**

Tratamiento	Actividad antibacteriana					
	Resistente ( $\leq 15\text{mm}$ )		Intermedia (16-20mm)		Sensible ( $\geq 21\text{mm}$ )	
	Rcto.	%	Rcto.	%	Rcto.	%
<i>S. areira</i> 100%	0	92.85%	13	92.85%	1	7.15%
<i>S. areira</i> 75%	12	85.71%	2	14.29%	0	0%
<i>S. areira</i> 50%	14	100%	0	0%	0	0%
<i>S. areira</i> 25%	14	100%	0	0%	0	0%
Ciprofloxacino	0	0%	0	0%	14	100.00%

**FUENTE:** Ficha de recolección de datos.

**ELABORACIÓN:** Propia.

**INTERPRETACIÓN:** Del aceite esencial de hojas de *S. areira* al 100% de concentración, un 7.15% de la muestra presentó actividad antibacteriana sensible y un 92.85% presentó actividad antibacteriana intermedia; el tratamiento con aceite esencial de hojas de *S. areira* al 75% no presentó actividad antibacteriana sensible, pero si intermedia en un 14.29%; en los tratamientos al 50 y 25% de concentración no se encontró actividad sensible ni intermedia, a diferencia del ciprofloxacino a 5mg, el cual presentó actividad antibacteriana sensible en un 100%.

**TABLA N° 2: Estadísticas descriptivas del halo de inhibición del aceite esencial de hojas de *S. areira* sobre *E. coli* Cepa ATCC 25922, comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro:**

Tratamiento	N°	Media	Desv. Desv.	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
<i>S. areira</i> 100%	14	18.57	1.16	17.90	19.24	17	21
<i>S. areira</i> 75%	14	14.29	0.99	13.71	14.86	13	16
<i>S. areira</i> 50%	14	11.64	0.93	11.11	12.18	10	13
<i>S. areira</i> 25%	14	9.86	0.86	9.36	10.36	9	11
Ciprofloxacino	14	33.07	1.21	32.37	33.77	30	34

**FUENTE:** Ficha de recolección de datos.

**ELABORACIÓN:** Propia.

**INTERPRETACIÓN:** El efecto antibacteriano del aceite esencial de hojas de *S. areira*, presentó su máxima actividad a una concentración del 100% (halo de inhibición media de  $18.57 \pm 1.16$  mm), seguida por el aceite al 75% (halo de inhibición media de  $14.29 \pm 0.99$  mm), el aceite al 50% y al 25% presentaron muy baja actividad antibacteriana (con halos de inhibición media de  $11.64 \pm 0.93$  mm y  $9.86 \pm 0.86$  mm respectivamente), siendo el ciprofloxacino a 5 mg quien presentó una actividad antibacteriana muy superior que las demás (halo de inhibición media de  $33.07 \pm 1.21$  mm).

**TABLA N° 3: Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis del halo de inhibición del aceite esencial de hojas de *S. areira* sobre *E. coli* Cepa ATCC 25922, comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro:**

	HALOS
H de Kruskal-Wallis	65.327
G1	4
Sig. Asintótica	0.000

**FUENTE:** Ficha de recolección de datos.

**ELABORACIÓN:** Propia.

**INTERPRETACIÓN:** Se determinó una diferencia altamente significativa entre los halos promedio de inhibición bacteriana, de los tratamientos administrados ( $p=0.000 < 0.05$ ).

#### IV. DISCUSIÓN.-

En el presente estudio se empleó el aceite esencial de las hojas de *Schinus areira* (molle peruano), cuya actividad antimicrobiana de sus frutos y hojas, han sido motivo de estudios a nivel nacional e internacional, donde se evidencian diversos grados de actividad antibiótica y antifúngica.

Algunos estudios como el de Rossetti V.<sup>19</sup> (Argentina 2014), quien determinó los componentes predominantes del aceite esencial de las hojas de *S. areira*, a los cuales se les atribuyen las propiedades antimicrobianas; encontró que resaltan los hidrocarburos monoterpenos ( $\alpha$  y  $\beta$  felandreno,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno mirceno, limoneno y p-cimeno) y sesquiterpenos ( $\beta$ -cariofileno, germacreno D y biciclogermacreno), componentes muy similares a los encontrados por Guerra L, et al.<sup>18</sup> (México 2017) y Martins M, et al.<sup>16</sup> (Portugal, 2013), quienes determinaron los componentes predominantes del aceite esencial de las hojas de *S. molle*, con la diferencia de que en el aceite de *S. areira*, el terpeno predominante es el limoneno y en el aceite de *S. molle* es el  $\alpha$ -felandreno.

Dentro de los trabajos donde se evalúa la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *S. areira*, encontramos el de Celaya L, et al. (Argentina 2016), quienes encontraron actividad moderada dosis dependiente contra *S. aureus* y *E. faecalis* (bacterias gram positivas), no siendo así contra *E. coli* (gram negativa). Gómez E. (Perú 2017), evaluó el extracto alcohólico de hojas de *S. molle* sobre *Streptococcus mutans* (gram positiva), encontrando actividad en todas las concentraciones evaluadas, siendo las de 25 y 22.5% las de mayor actividad. Así mismo Guerra L, et al. (México 2017) determinó actividad antimicrobiana del aceite esencial de la hoja de *S. molle* frente a *S. aureus*, y *S. pyogenes* (gram positivas). También Luque P. (Perú 2016), encontró una mayor sensibilidad de *S. saprofiticus* y *S. aureus* (gram positivas), a un volumen de 25 ml del aceite esencial del fruto de *S. molle*. Como se puede observar, la presencia de actividad antibacteriana sobre bacterias gram positivas a bajas concentraciones, indica una mayor susceptibilidad de estas al aceite esencial de *S. molle* y probablemente al de *S. areira*.

Otro punto relevante de las investigaciones realizadas con el aceite esencial de *S. molle*, son las diferencias marcadas en sus determinaciones, por ejemplo: Guerra L, et al. (México 2017), encontraron actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas más no de los frutos, a diferencia de Luque P. (Perú 2016) y Martins M, et al. (Portugal, 2013), quienes encontraron actividad antibacteriana del aceite esencial del fruto, la respuesta a esta discrepancia probablemente la tenga Hosni K, et al. (Túnez, 2011), quienes evaluaron las variaciones de las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de los frutos de *S. molle*, en diferentes periodos de maduración frente *E. coli*, determinando que los frutos maduros y en maduración intermedia presentan actividad antibacteriana, siendo estos últimos los que presentaron mayor eficiencia, probablemente por su riqueza en compuestos oxigenados. Por esto, en la presente investigación no se empleó el aceite esencial de los frutos, para evitar sesgos en la actividad antibacteriana presentada.

En esta investigación se empleó la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, un bacilo gram negativo de la familia enterobacteriaceae, clasificado por su propiedad antigénica como serotipo O6 - biotipo 1, que no presenta capacidad para producir verotoxina. Esta es una cepa estándar recomendada por la CLSI, para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Si bien la *E. coli* pertenece a la microflora intestinal, se le puede encontrar en el sistema respiratorio alto y el aparato genital, donde no genera daño alguno, siendo considerado como patógeno cuando alcanza tejidos fuera de sus zonas habituales. La mayor cantidad de infecciones producidas por *E. coli* no son mortales, sin embargo en países en vías de desarrollo como el nuestro, este patógeno es un gran problema de salud pública.

El fármaco con el cual se comparó la actividad del aceite esencial de *S. areira*, es un antibiótico muy empleado para las infecciones causadas por este patógeno, llegando a emplearse en algunos casos de forma inadecuada (poca adherencia al tratamiento). El ciprofloxacino es una fluoroquinolona que presenta moderada actividad contra grampositivos y gran actividad contra gramnegativos como la *E. coli*, pero que presenta la desventaja de presentar resistencia al mismo, esta investigación apoya la búsqueda de tratamientos médicos alternativos, que no presenten el riesgo de generar resistencia.

Para evaluar la actividad antibiótica del aceite esencial de hojas de *S. areira*, y del ciprofloxacino frente a *E. coli*, se empleó el método de difusión en disco, siguiendo los parámetros establecidos por la CLSI (Anexo5), la cual establece los valores de referencia para los halos de inhibición de crecimiento bacteriano para ciprofloxacino a 5ug de concentración como: resistente  $\leq 15$ mm, actividad intermedia 16 - 20mm y sensible  $\geq 21$ mm. El aceite de *S. areira* se diluyo con DMSO obteniéndose 4 concentraciones: 100%, 75%, 50% y 25% y junto al ciprofloxacino se evaluaron 5 tratamientos con un control negativo realizado con DMSO puro (Tabla N°1). Se encontró que el aceite esencial de *S. areira* al 100% presentó un 7.15% de actividad antibacteriana sensible, seguida por un 92.85% de actividad antibacteriana intermedia; el aceite esencial de *S. areira* al 75% no presentó actividad antibacteriana sensible, pero si intermedia en un 14.29%; el aceite esencial de *S. areira* al 50 y 25% no presentaron actividad alguna, en el caso del ciprofloxacino a 5mg se evidenció actividad sensible en un 100%.

En el análisis estadístico de los datos obtenidos de los halos de inhibición antibacteriana generados por los tratamientos con el aceite esencial de hojas de *S. areira*, (Tabla N°2) se determinó que el aceite esencial de *S. areira* al 100% presentó la máxima actividad con un halo de inhibición media de  $18.57 \pm 1.16$  mm, seguida por el aceite al 75% con un halo de inhibición media de  $14.29 \pm 0.99$  mm, el aceite al 50% y al 25% presentaron muy baja actividad antibacteriana con halos de inhibición media de  $11.64 \pm 0.93$  mm y  $9.86 \pm 0.86$  mm respectivamente, siendo el ciprofloxacino a 5 mg que presentó una actividad antibacteriana muy superior que las demás alcanzando un halo de inhibición media de  $33.07 \pm 1.21$  mm.

Estos valores son similares a los obtenidos por Luque P. (Perú 2016), quien con el método de difusión por excavación en placa, a un volumen de 0.25 ml al 100% de aceite esencial de hoja de *S. molle*, encontró un halo de inhibición promedio para *E. coli* de 18.10 mm. En otra investigación Martins M, et al. (Portugal, 2013), determinaron una MIC de 1000  $\mu$ g/ml tanto para el aceite esencial de hojas como frutos de *S. molle*, obteniendo para esta halos de  $7.7 \pm 0.6$  mm para el aceite de hojas y de  $6.3 \pm 0.1$  mm para el aceite de frutos, concluyendo que existe actividad antibacteriana frente a *E. coli*.

Como el tamaño muestral es pequeño, para determinar la normalidad se aplicó el test de Shapiro – Wilk (Tabla N°4 - Anexo 7), encontrándose que no todos los tratamientos presentaron un comportamiento normal y para determinar la homogeneidad se aplicó la prueba de Levene (Tabla N°5 - Anexo 8) encontrándose que no existe diferencia entre las variaciones en la población, con estas determinaciones hechas se aplicó la prueba de Kruskal – Wallis (Tabla N°3) encontrándose una diferencia altamente significativa entre los halos promedio de inhibición bacteriana, por lo tanto se puede afirmar que la actividad antibacteriana difiere entre los tratamientos evaluados (Figura N°1 - Anexo 6).

## **V. CONCLUSIONES.-**

1. El aceite esencial de *S. areira* a concentraciones superiores del 75%, presenta actividad antibacteriana intermedia sobre *E. coli*.
2. El ciprofloxacino a 5mg presenta actividad antibacteriana sensible en su totalidad sobre *E. coli*.
3. El aceite esencial de *S. areira* no presenta mayor actividad antibacteriana que ciprofloxacino.



## VI. RECOMENDACIONES.-

Como el presente estudio se ha realizado de forma experimental *in vitro*, se recomienda la realización de investigaciones complementarias, como la evaluación de la toxicidad, la dosis letal en animales inferiores, una vez confirmada su inocuidad, y basándose en los resultados obtenidos en el presente estudio, se recomienda el uso del aceite esencial de hojas de *S. areira* al 100% de concentración como tratamiento alternativo o coadyuvante contra patologías ocasionadas por *E coli*, por ser de fácil obtención, económico, de fácil acceso en zonas rurales y alto andinas, además de que al contener diferentes compuestos volátiles biológicamente activos, este brinde beneficios terapéuticos adicionales en los demás sistemas que conforman el cuerpo humano (sistema nervioso, cardiovascular, respiratorio, entre otros).

Todas las investigaciones revisadas indican una alta susceptibilidad por parte de las bacterias gram positivas al aceite esencial de *S. molle*, debido a que esta especie comparte muchos metabolitos secundarios con *S. areira*, es probable que presenten una alta susceptibilidad a esta también, es por esto que se recomienda realizar investigaciones orientadas a evaluar su efectividad sobre microorganismos gram positivos.

Debido a que los trabajos donde se emplea el aceite esencial de los frutos de *S. molle* presentan mucha divergencia, se recomienda que para futuras investigaciones con esta especie o con *S areira*, se deben determinar variables como el nivel de madurez y el fotoperiodo, de esta manera estos parámetros ayudarían a la replicación correcta de estos.

## VII. REFERENCIAS.-

1. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, consultado el 07 de Abril del 2018, disponible en: <<http://www.tropicos.org/Name/1300644>>.
2. The International Plant Names Index (IPNI), consultado el 07 de Abril del 2018, disponible en: <<http://www.ipni.org/index.html>>.
3. Rivadeneira C, Álvarez V. Aceite esencial de *Schinus molle* L. (Molle) como potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro. KIRU. 2015;12(2):8-14. Disponible en: [http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2015/Kiru\\_12-2\\_v\\_p7-13.pdf](http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2015/Kiru_12-2_v_p7-13.pdf).
4. Gualtieri M, Araque M, Carmona J, García M, Di Bernardo M, Ríos N, et al. Actividad antibacteriana del *Schinus molle* L. cultivado en Italia. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel [revista en la Internet]. INHRR 43 (2) 2012. [Consultado el 01 de Mayo del 2018] Disponible en: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:dZjlAFVfK4MJ:www.scielo.org.ve/scielo.php%3Fscript%3Dsci\\_arttext%26pid%3DS0798-04772012000200002+&cd=2&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe&client=firefox-b](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:dZjlAFVfK4MJ:www.scielo.org.ve/scielo.php%3Fscript%3Dsci_arttext%26pid%3DS0798-04772012000200002+&cd=2&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe&client=firefox-b).
5. Cruz C, Rodríguez N, Rodríguez N. Evaluación In Vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 13 (2): 117-124, 2010. [Consultado el 01 de Mayo del 2018] Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n2/v13n2a14.pdf>.
6. Celaya L, Viturro C, Silva L, Moreno S. Natural antioxidants isolated from *Schinus areira* leaves by ultrasound-assisted extraction. International Journal of Food Studies. 5, 2016. pp 167–179. [Consultado el 05 de Noviembre del 2018] Disponible en: <https://www.iseki-food-ejournal.com/ojs/index.php/e-journal/article/view/329>.
7. Carrasco R. Estudio de los aceites y determinación de la actividad antimicrobiana del fruto de *Schinus molle* L. “Molle” [Tesis para optar el grado de Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1998. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6309>.
8. Solis L, Tomaylla C, Callo Y, Solís A, Rodeiro I, Hernández I, et al. Chemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of essential oil from *Schinus*

- areira* L. and *Minthostachys spicata* (Benth.) Epl. grown in Cuzco, Perú. Journal of Essential Oil Research. 2015. [Consultado el 05 de Noviembre del 2018] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2015.1120691>.
9. Celaya L, Alabrudzińska M, Molina A, Viturro C, Moreno S. The inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by essential oils isolated from leaves and fruits of *Schinus areira* depending on their chemical compositions. Acta Biochimica Polonica. 61 (1) 2014. pp 41–46. [Consultado el 05 de Noviembre del 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24644552>.
  10. Brooks G, Carrol K, Buyel J, Morse S, Migtzner T. Jawetz, et al. Microbiología médica. 25ª ed. Estados Unidos, Ed: McGraw-Hill-Lange; 2011. pp. 213-220.
  11. Ryan K, Ray C, Sherris J, Ahmad N, Drew W, Plorde J. Sherris Microbiología Médica. 5ª ed. Estados Unidos, Ed: McGraw-Hill-Lange; 2011. pp. 444-453.
  12. Murray P. Rorenthall K. Pfaller M., Microbiología médica. 7ª ed. España, Ed: Elsevier-Saunders; 2014. Pp. 258-266.
  13. Ochoa T, Mercado E, Durand D, Rivera F, Mosquito S, Contreras C, et al. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 28 (1) 2011. pp 13-20. [Consultado el 05 de Noviembre del 2018]. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/Medicina\\_Experimental/v28\\_n1/pdf/a03v28n1.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/Medicina_Experimental/v28_n1/pdf/a03v28n1.pdf).
  14. Riveros M, Ochoa T. Enteropatógenos de importancia en salud pública. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 32 (1) 2015. pp 17-64. [Consultado el 05 de Noviembre del 2018]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v32n1/a22v32n1.pdf>.
  15. Katzung B, Masters S, Trevor A. Farmacología Básica y Clínica, 12ª ed. México, Ed: McGraw-Hill-Lange; 2013.
  16. Martins M, Arantes S, Candeias F, Tinoco M, Cruz J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. Journal of Ethnopharmacology (Forthcoming, Accepted 28 October 2013), Elsevier Ireland Ltd. [Consultado el 01 de Mayo del 2018] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.063i>.
  17. Hosni K, Jemli M, Dziri Z, M'rabet Y, Ennigrou A, Sghaier A, et al. Changes in phytochemical, antimicrobial and free radical scavenging activities of the Peruvian

- pepper tree (*Schinus molle* L.) as influenced by fruit maturation. *Industrial Crops and Products International journal* 34 (2011) 1622– 1628, Elsevier B.V. [Consultado el 01 de Mayo del 2018] Disponible en: doi:10.1016/j.indcrop.2011.06.004.
18. Guerra L, Álvarez R, Salazar R, Torres A, Rivas V, Waksman N, et al. Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactinia mexicana*, and *Schinus molle* found in northeast Mexico. *Natural Product Communications* 8 (1) 2013: 135 - 138. [Consultado el 01 de Mayo del 2018]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/235893092>.
  19. Rossetti V. Efectos Morfométricos, Bioquímicos y Cardiovasculares del aceite esencial y de terpenos hidrocarburos de *Schinus areira* (Anacardiaceae) en un modelo experimental en animales. [Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud]. Cordova: Universidad Nacional de Córdoba; 2014. Disponible en: [http://lildbi.fcm.unc.edu.ar/lildbi/tesis/rossetti\\_victor\\_luis.pdf](http://lildbi.fcm.unc.edu.ar/lildbi/tesis/rossetti_victor_luis.pdf).
  20. Gómez E. Efecto Antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Schinus Molle* (Molle) sobre *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 [Tesis para obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista]. Piura: Universidad Cesar Vallejo; 2017. Disponible en: <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/UCV/11048>.
  21. Luque P. Actividad Antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Schinus molle* L. frente a cepas de *Staphylococcus saprofíticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica* y *Escherichia coli*. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Alas Peruanas; 2016. Disponible en: <http://repositorio.uap.edu.pe/handle/uap/3770>.
  22. Southwick S. Enfermedades infecciosas, 2ª ed. México, Ed: McGraw-Hill-Lange; 2009. pp 194-195.
  23. Canat M, Navarro R, Velazquez G, Rivelli S, Céspedes A. Caracterización molecular de factores de virulencia aislados de *Escherichia coli*. *Pediatría Asunción* 43 (1) 2016. [Consultado el 01 de Mayo del 2018] Disponible en: [http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1683-98032016000100002](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-98032016000100002).
  24. Kasper D, Hauser S, Jameson L, Fauci A, Longo D, Loscalzo J, editores. Harrison, Principios de Medicina Interna, 19ª ed. México, Ed: McGraw-Hill Interamericana; Vol 1, 2016. pp. 857.

25. DIGEMID. Centro de atención farmacéutica: Ciprofloxacino. Dirección general de medicamentos, insumos y drogas. MINSA, 2017. [Consultado el 01 de Mayo del 2018]. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/ciprofloxacino.pdf>.
26. Martínez R. Estudio Taxonomico-Biometrico de *Schinus molle* y *Schinus areira* (Anacardiaceae), Bonplandia, 1 (3) 1963. pp. 225-244. Publicado el 24/06/2014 por el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE). [Consultado el 01 de Mayo del 2018] Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/41941089>.
27. *Schinus molle* L. var *areira* (L.) DC. [Internet]. Australia: Environmental Weeds of Australia for Biosecurity Queensland. [Última actualización: 2016] Enlace del Departamento de Empleo, Desarrollo Económico e Innovación (DEEDI). [Consultado el 01 de Mayo del 2018] Disponible en: [https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/schinus\\_molle\\_var\\_areira.htm](https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/schinus_molle_var_areira.htm).
28. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Taxonomía de las Fanerógamas útiles Del Perú. 1ª ed. Perú, Ed: Normas Legales S.A.C.; 2002, Vol 1 pp. 456-458.
29. Stashenko E. Aceites Esenciales, 1º edición. Colombia: Universidad Industrial de Santander; 2009, pp. 15. Disponible en: [cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf](http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf).
30. Cárdenas M. Determinación de parámetros de operación para la destilación por arrastre con vapor de agua del aceite esencial de Molle (*Schinus molle* Linneo) en el equipo modular de extracción de aceites esenciales de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia [Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico]. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2014. Disponible en: [repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/1032/Tesis%20Q472\\_Car.pdf](http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/1032/Tesis%20Q472_Car.pdf).
31. Arraiza M. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales, unidad 6, tema 12 [Curso en Internet]. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid. 2010 Mayo [Consultado el 01 de Mayo del 2018]. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/programa>.
32. Peredo H, Palou E, López A. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas selectos de Ingeniería de alimentos 3-1 (2009): 24-32. [Consultado el 01 de Mayo del

- 2018]. Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf).
33. Florez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología Humana, 6ª ed. España, Ed: Elsevier – Masson; 2014, pp 964.
  34. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26ª ed. CLSI Supplement M100S. 19087 USA, 2016. ISBN 1-56238-923-8. [Consultado el 04 de Mayo del 2018] Disponible en: <http://ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>.
  35. García J, Reding A, López J. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. México. Elsevier. 2013. [Consultado el 04 de Abril del 2018]. Disponible en: [http://riem.facmed.Unam.mx/sites/all/archivos/V2Num04/07\\_mie\\_calculo\\_del\\_tamano.pdf](http://riem.facmed.Unam.mx/sites/all/archivos/V2Num04/07_mie_calculo_del_tamano.pdf).
  36. Sacsquispe R. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2010. [Consultado el 01 de Mayo del 2018] Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.Pdf>.
  37. Laboratorios Britania S.A. Mueller – Hinton Caldo, Argentina, 01, 2015. [Consultado el 04 de Mayo del 2018] Disponible en: [http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a284420749cd.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a284420749cd.pdf).

## VIII. ANEXOS.-

### ANEXO 1

#### METODOLOGIA EMPLEADA <sup>(36,37)</sup>

**Tratamiento de la muestra:** Se adquirieron 6 Kg de droga vegetal fresca de *Schinus areira* “Molle peruano”, en el CAFAE (Comité de Administración del Fondo de Asistencia y Estímulo de la Gerencia Regional de Agricultura - Prolongación Unión N° 2562 - Trujillo), esta se llevó al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionó a los ejemplares en mejores condiciones; así se obtuvo la muestra fresca, la cual se lavó con agua destilada clorada y se colocó sobre una bandeja de cartulina, la misma que se colocó en un horno a 40 – 45°C por 3 a 4 días, para su deshidratación. Luego se fraccionó la muestra seca manualmente, hasta obtener partículas muy pequeñas y se almacenó herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como muestra seca (MS).

**Obtención del Aceite Esencial:** Se obtuvo empleando el método de arrastre con vapor de agua; en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS, hasta que alcanzó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en una pera de decantación. El Balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor al pasar por el condensador se precipitó a medio líquido, y fue recepcionado en la pera decantadora (durante 2 horas). Por diferencia de densidades el líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie (esto permitió eliminar el agua), el aceite se desecó con ayuda de sulfato de sodio anhidro, y se pasó por papel filtró para eliminar el desecante con ayuda de una bomba de vacío, así se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar para evitar que las ondas de luz oxiden sus compuestos, asimismo se reservó a 4°C hasta su uso.

**Preparación del medio de cultivo:** Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó medio para 14 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió entre 18 a 20 ml en las Placas Petri estériles de plástico descartables, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

**Obtención de la cepa de *E Coli*:** Se obtuvo del Instituto Nacional de Salud - Lima.

**Preparación del inóculo:** Se colocaron de 3 a 4 ml de NaCl 9% en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota de *E. coli* cepa ATCC 25922 (previamente cultivada entre 18 a 20 horas), hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland (asegurando un inóculo microbiano equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml aprox.).

**Siembra del microorganismo:** Con ayuda de un hisopo estéril embebido del inóculo de *E. coli* cepa ATCC 25922, se procedió a la siembra, deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (la técnica es conocida como siembra por estrías en superficie); de este modo el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

**Preparación de las diluciones del AE:** Empleando como solvente emulsificante el Dimetil Sulfoxido (DMSO), se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%); separándolas en 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles (previamente rotulados), se colocó 750 µL de AE y 250 µL de DMSO al tubo de 75%, 500 µL de AE y 500 µL de DMSO al tubo de 50%, y 250 µL de AE y 750 µL de DMSO al tubo de 25%.

**Preparación de los discos de sensibilidad con el AE:** Con ayuda de una micropipeta se colocaron 10 µL de cada concentración, en discos de papel filtro Whatman N° 1 previamente esterilizados (de 6mm de diámetro). Esto se repitió 14 veces.

**Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar):** Se utilizó el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para esto, se tomó en consideración los criterios del



Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. También se tomaron en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

**Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano:** Empleando una pinza metálica estéril, se colocaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración del AE, en la superficie del agar sembrado con *E. coli*, a una distancia de 1 cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante entre ellos. En la parte central se colocó el disco con ciprofloxacino (control positivo). Se dejaron en reposo unos 15 min y se incubaron colocándose de forma invertida en estufa a 35 - 37°C por 20 horas.


**Lectura e interpretación:** La lectura se realizó midiendo con una regla Vernier, registrándose el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano para cada una de las concentraciones del AE de las hojas de *Schinus areira* y el ciprofloxacino. Estableciéndose como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.

## ANEXO 2

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS VALIDADA

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Aceite esencial de Molle				Ciprofloxacino	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						

**Fuente:** Elaboración propia.

  
 Dra. María Ayela R.

  
 Dr. Steve T. Hurtado Escamilo  
 MICROBIÓLOGO CLÍNICO  
 Especialista en Análisis Clínicos y Biológico  
 CBP: 2296 RNBE:0032  
 RED ASISTENCIAL LA LIBERTAD  
 AS-ESalud

### ANEXO 3

#### HALOS DE INHIBICIÓN PARA CADA TRATAMIENTO

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
Nº	Aceite esencial de Molle				ciprofloxacino	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1	18	14	12	11	34	0
2	20	14	12	10	32	0
3	18	15	11	10	34	0
4	19	13	12	10	33	0
5	21	14	12	9	34	0
6	18	14	11	11	33	0
7	17	15	10	11	30	0
8	18	13	13	9	32	0
9	19	14	11	9	34	0
10	18	16	12	9	34	0
11	20	15	10	10	33	0
12	18	14	12	9	32	0
13	19	13	13	11	34	0
14	17	16	12	9	34	0

**Fuente:** Observación directa.

## ANEXO 4

### CLAVE PROVISIONAL PARA DETERMINAR LOS GENEROS DE ANACARDIACEAE MÁS IMPORTANTES DEL PERU. <sup>(28)</sup>

1. Hojas simples ..... 2  
Hojas compuestas ..... 6
2. Hojas sésiles o subsésiles, linear-lanceoladas; flores femeninas apétalas ..... **HAPLORHUS**  
Hojas pecioladas; pétalos siempre presentes ..... 3
3. Carpelo uno; estilo excéntrico o lateral; estigma simple ..... 4  
Carpelos 3; estilo corto con 3 estigmas; 10 estambres fértiles ..... 5
4. Estambres 8 - 10, algunos o todos fértiles; estilo excéntrico; fruto drupa carnosa, con  
receptáculo ensanchado y carnoso ..... **ANACARDIUM**  
Estambres 1- 5, uno o dos fértiles; estilo lateral; fruto drupa carnosa, con receptáculo  
no ensanchado ..... **MANGUIFERA**
5. Drupa comprimida, exocarpo no caedizo ..... **MAURIA**  
Drupa globosa, exocarpo caedizo ..... 6
6. Estambres 2 veces tanto como pétalos ..... 7  
Estambres tantos como pétalos (o sépalos) ..... 10
7. Estilos y lóculos del ovario (3) 4 - 5, (en **Tapiria** unilocular) drupa ovoidea o subglobosa,  
cuando son 3 estilos, entonces flores rojas e inflorescencia lateral sobre nudos sin hojas ..... 8  
Estilo 1, a veces trifido; ovario 1 - locular ..... 9
8. Ovario y estilo pubescentes; pétalos con punta unciforme, ovario unilocular; foliolos  
opuestos o subopuestos ..... **TAPIRIRA**  
Ovario y estilo glabros; pétalos con punta no unciforme, ovario 3 - 5 locular; foliolos a  
menudo opuestos y alternos, a veces en la misma hoja ..... **SPONDIAS**
9. Pétalos agudos o subacuminados; foliolos peciolulados; drupa comprimida, endocarpo  
cartaceo ..... **MAURIA**  
Pétalos obtusos, redondeados o truncados; foliolos sésiles o subsésiles; drupa no  
comprimida, endocarpo óseo ..... **SCHINUS**
10. Drupa comprimida hacia el ápice, alada o sub alada ..... 11  
Drupa ni comprimida ni alada ..... 12
11. Foliolos peciolulados, 2 - 5 pares ..... **LOXOPTERYGIUM**  
Foliolos sésiles, 6 - 15 pares ..... **SCHINOPSIS**
12. Cáliz alado acrescente en el fruto; drupa de forma variada; hojas imparipinnadas con  
más o menos 5 pares de foliolos ..... **ASTRONIUM**  
Cáliz no acrescente; drupa globosa, blanca, más o menos 5 - 9 mm de diámetro; hojas  
imparipinnadas con 4 - 8 pares de foliolos ..... **TOXICODENDRON**

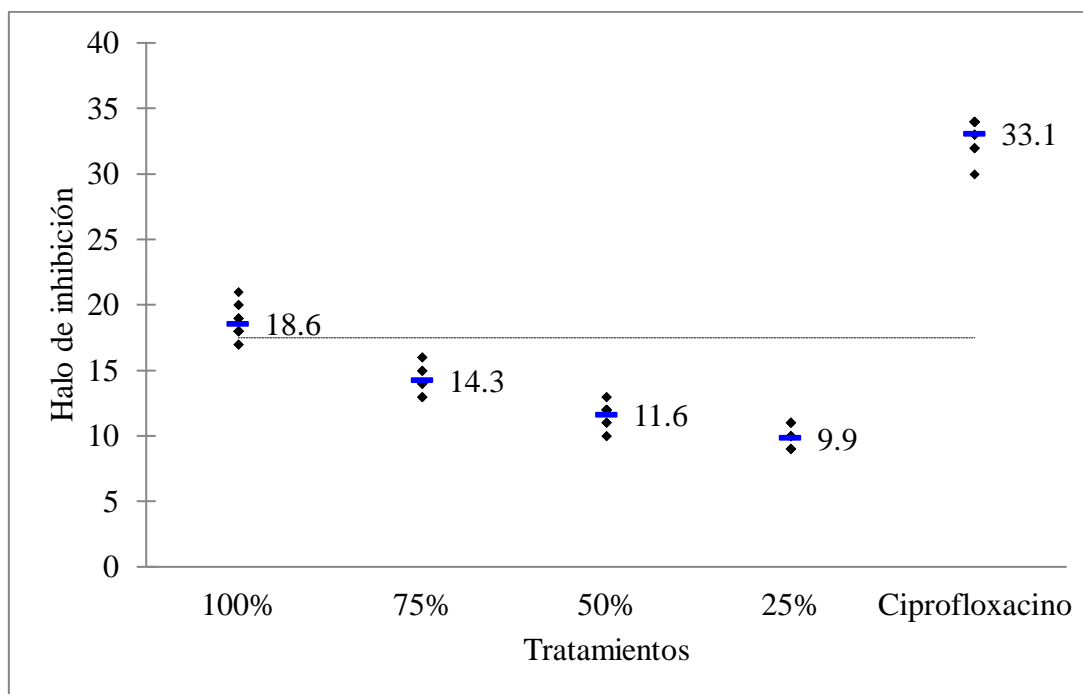
## ANEXO 5

### VALORES DE REFERENCIA DE LOS HALOS DE INHIBICION BACTERIANA PARA LAS QUINOLONAS Y FLUOROQUINOLONAS FRENTE A *E. COLI* <sup>(34)</sup>

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)				MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
QUINOLONES AND FLUOROQUINOLONES for <i>Enterobacteriaceae</i> except <i>Salmonella</i> spp. (Please refer to Glossary I.)										
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	–	16–20	≤15	≤1	–	2	≥4
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	–	14–16	≤13	≤2	–	4	≥8
O	Cinoxacin	100 µg	≥19	–	15–18	≤14	≤16	–	32	≥64
O	Enoxacin	10 µg	≥18	–	15–17	≤14	≤2	–	4	≥8
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	–	15–17	≤14	≤2	–	4	≥8
O	Gemifloxacin	5 µg	≥20	–	16–19	≤15	≤0.25	–	0.5	≥1
O	Grepafloxacin	5 µg	≥18	–	15–17	≤14	≤1	–	2	≥4
O	Lomefloxacin	10 µg	≥22	–	19–21	≤18	≤2	–	4	≥8
O	Ofloxacin	5 µg	≥16	–	13–15	≤12	≤2	–	4	≥8
U	Nalidixic acid	30 µg	≥19	–	14–18	≤13	≤16	–	–	≥32
U	Norfloxacin	10 µg	≥17	–	13–16	≤12	≤4	–	8	≥16
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥19	–	16–18	≤15	≤2	–	4	≥8

## ANEXO 6

### HALOS PROMEDIO PARA CADA TRATAMIENTO EMPLEADO



**FIGURA N°1:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de *S. areira* sobre *E. coli* Cepa ATCC 25922, comparado con Ciprofloxacino, a través del halo de inhibición.

## ANEXO 7

### PRUEBA DE NORMALIDAD

**TABLA N° 4: Test de Shapiro - Wilk para los tratamientos empleados para determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *S. areira* sobre *E. coli* Cepa ATCC 25922, comparado con ciprofloxacino:**

Test de Shapiro - Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.
Molle 100 %	0.902	14	0.120
Molle 75 %	0.882	14	0.061
Molle 50 %	0.869	14	0.040
Molle 25 %	0.786	14	0.003
Ciprofloxacino	0.778	14	0.003

**FUENTE:** Ficha de recolección de datos.

**ELABORACIÓN:** Propia.

**INTERPRETACIÓN:** Se concluye en base a los datos obtenidos para los tratamientos de aceite esencial de hojas de *S. molle* a concentraciones de 50 y 25% y del ciprofloxacino, no presentaron un comportamiento normal ( $p < 0.05$ ), por lo cual se sugiere la prueba no paramétrica de Kruskal wallis.

## ANEXO 8

### PRUEBA DE HOMOGENEIDAD

**TABLA N° 5: Estadísticas de homogeneidad de varianzas de Levene**

	Estadístico de Levene	gl <sub>1</sub>	gl <sub>2</sub>	Sig.
Se basa en la media	0.412	4	65	0.799
Se basa en la mediana	0.329	4	65	0.857
Se basa en la mediana y con gl ajustado	0.329	4	56.525	0.857
Se basa en la media recortada	0.394	4	65	0.812


**FUENTE:** Ficha de recolección de datos.

**ELABORACIÓN:** Propia.

**INTERPRETACIÓN:** El análisis, establece que la hipótesis nula de igualdad de varianzas se acepta, por lo tanto se concluye que no existe diferencia entre las variaciones en la población.




## ANEXO 9

**San Jose**  
**LABORATORIO CLINICO**  
*Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud*

**CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO**

El Laboratorio “San José” deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde el Sr. MIGUEL ALEJANDRO SUÁREZ ANAYA estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado “Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Schinus areira* sobre *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro”, durante los días 2 al 8 de setiembre de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 12 días del mes de setiembre de 2018.

  
José Luis Caila Quevea  
MICROBIOLOGO - MICROBIOLOGO  
C.B.P. 0301

**Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo**  
**Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo**  
☎ 769999 - ☎ 948649844  
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/

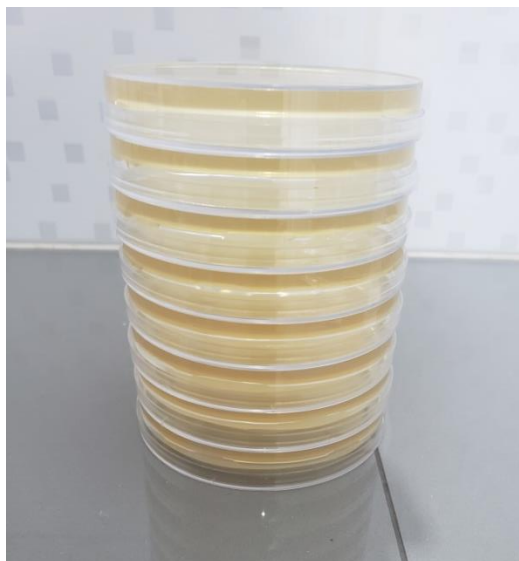
## ANEXO 10

### GALERIA DE IMÁGENES

#### 1. Recepción en pera decantadora del aceite esencial de *Schinus areira*:



#### 2. Preparación de placas Petri con agar Mueller-Hinton para siembra:



### 3. Preparación del inóculo:



### 4. Siembra del microorganismo:





## 5. Preparación de las diluciones del AE:



## 6. Preparación de los discos de sensibilidad con el AE:



## 7. Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano:



## 8. Lectura e interpretación:

